

Isolation of CD34 Positive Hair Follicle Stem Cells Using Magnetic Activating Cell Sorting (MACS) Method

Heydari Tajaddod Sh^{1,2}, Najafzadeh N^{*2}, Mahdavi Rad M³, Sheikhanloui Milan H⁴,
Kalarestaghi H², Nejati V¹

1. Department of Biology, School of Sciences, Urmia University, Urmia, Iran

2. Department of Anatomy and Pathology, Research Laboratory for Embryology and Stem cell, School of Medicine, Ardabil University of medical Sciences, Ardabil, Iran

3. Department of Biology, Tehran Shargh Branch, University of Payame Noor, Tehran, Iran

4. Department of Physiology, School of Medicine, Ardabil University of medical Sciences, Ardabil, Iran

* **Corresponding Author.** Tel: +989356912462 Fax: +984533518793 E-mail: n. najafzade@arums.ac.ir

Received: Jan 15, 2015

Accepted: May 13, 2015

ABSTRACT

Background & objectives: Hair follicle stem cells (HFSCs) are multipotent and various types of HFSCs were introduced. HFSCs separation using cell surface markers is one of the interesting strategies in the replacement of old methods. In this study, we used magnetic activating cell sorting (MACS) to separate HFSCs.

Methods: In this study, HFSCs were isolated from Balb/c mice and dissected under an invert microscopy, and bulge area isolated and the bulge cells cultivated about 14 days. The CD34 positive cells isolated using CD34 monoclonal antibody and magnetic activated cell sorting system (MACS), then the cells incubated in DMEM/F12 and 10% FBS. The CD34 positive cells counted using a neubauer slide and evaluated under a fluorescent microscopy.

Results: Here, we isolated CD34 positive cells using MACS and $12 \pm 1.04\%$ of HFSCs were CD34 positive and we found that, CD34 positive cells survived during 7 days cell culture in vitro.

Conclusion: The results show that MACS is useful to increasing density gradient of cells in vitro.

Keywords: Hair Follicle Stem Cells, Magnetic Activating Cell Sorting, CD34, Fluorescent Microscopy.

جداسازی سلول‌های بنیادی فولیکول مو CD34 مثبت با استفاده از سیستم جداسازی سلولی در میدان آهن ربایی

شیرین حیدری تجدد^{۱،۲}؛ نوروز نجف زاده^{۲*}؛ مینا مهدوی راد^۳؛ حمید شیخکانلوی میلان^۴؛ حسین کلارستانی^۲؛ وحید نجاتی^۱

۱. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران ۲. گروه علوم تشریحی و پاتولوژی، آزمایشگاه تحقیقات جنین شناسی و سلول‌های بنیادی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران ۳. گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور واحد تهران شرق، تهران، ایران ۴. گروه فیزیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اردبیل، اردبیل، ایران * نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۳۵۶۹۱۲۴۶۲؛ فاکس: ۰۴۵۳۳۵۱۸۷۹۳؛ پست الکترونیک: n. najafzade@arums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: سلول‌های بنیادی فولیکول مو چند توان هستند و چندین نوع سلول بنیادی در ناحیه بالچ فولیکول مو شناسایی شده است. جداسازی دقیق سلول‌های بنیادی فولیکول مو با استفاده از مارکرهای سطحی یکی از روش‌های مناسب جهت جایگزینی روش‌های جداسازی قدیمی محسوب می‌شود. در این مطالعه از روش جداسازی سلول در میدان آهنربایی برای جداسازی سلول‌های بنیادی فولیکول مو استفاده شده است.

روش کار: در این مطالعه فولیکول موی سبیل موش سوری نژاد Balb/c در زیر میکروسکوپ معکوس تشریح شد و نواحی حاوی سلول‌های بنیادی فولیکول مو (بالچ) جدا شد و نواحی بالچ به مدت ۱۴ روز کشت داده شدند. سلول‌های CD34 مثبت با روش جداسازی سلول در میدان آهنربایی و توسط آنتی بادی مونوکلونال CD34 متصل به میکروبیید جداسازی شدند و در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ۱۰٪ سرم گاوی کشت داده شدند و تعداد سلول‌های CD34 با استفاده از لام نتوبار شمارش شدند و در زیر میکروسکوپ فلوروسنت سلول‌های CD34 مثبت مشاهده شدند.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان داد که جداسازی سلول‌های بنیادی CD34 مثبت با روش مکس (MACS) موفقیت‌آمیز بوده و ۱۲±۱/۰۴ درصد سلول‌های CD34 مثبت بودند و این سلول‌ها بعد از یک هفته کشت در محیط کشت زنده ماندند.

نتیجه گیری: یافته این مطالعه نشان داد که روش جداسازی سلولی در میدان آهنربایی باعث افزایش تراکم سلول‌های بنیادی فولیکول مو در محیط کشت می‌شود.

واژه‌های کلیدی: سلول‌های بنیادی فولیکول مو، روش جداسازی سلولی آهنربایی، CD34، میکروسکوپ فلوروسنت

دریافت: ۹۳/۱۰/۲۵ پذیرش: ۹۴/۲/۲۳

مقدمه

سلول‌های بنیادی به دو دسته تقسیم می‌شوند که شامل سلول‌های بنیادی جنینی که از توده سلولی داخل جنین در مرحله بلاستوسیت بدست می‌آید و دسته دوم سلول‌های بنیادی بالغین می‌باشد. اساسا توانایی ترمیم سلولی به سلول‌های بنیادی بالغین وابسته است. سلول‌های بنیادی بالغ در بافت در محلی به نام آشیان قرار می‌گیرند که این سلول‌ها را از سیگنال‌های تمایزی و حتی آپوپتوزی محافظت می‌کند

[۱]. استفاده از سلول‌های بنیادی موجود در پوست و ضامم آن درپچه‌ای نوین روی محققان گشوده است، زیرا مخزن بالقوه‌ای از سلول‌ها هستند که قابلیت تکثیر، تمایز و تبدیل به سایر سلول‌ها از جمله سلول‌های نورونی را دارا می‌باشند [۲-۴]. سلول‌های بنیادی فولیکول مو در ناحیه بالچ^۱ فولیکول مو که قسمتی از غلاف ریشه‌ای خارج مو که بلافاصله در زیر

^۱ Bulge

عضله راست کننده مو است، قرار دارد [۵]. سلول‌های بنیادی فولیکول مو نقش اساسی در شکل‌گیری فولیکول مو دارند [۶]. این سلول‌ها حالت چند توانی داشته و می‌توانند به انواع سلول‌های اپی‌تلیالی همچون سلول‌های شوان، آستروسیت، الیگودندروسیت و نورون تمایز پیدا کنند [۳،۲].

جهت تهیه سلول‌های بنیادی فولیکول مو نیاز به روش‌های تهاجمی نیست، اول اینکه سلول‌های بنیادی فولیکول مو براحتی قابل دسترسی هستند و به آسانی می‌توان سلول‌های بنیادی پوست را با بیوپسی برداشت. دوم اینکه سلول‌های بنیادی پوست از لحاظ ایمنی ارجح‌ترند مولکول MHC^۱ Class 1 در اینها بیان نمی‌شود. سومین دلیل اینکه سلول‌های بنیادی بدست آمده از فولیکول مو قدرت تکثیر بالایی دارند [۷]. از این رو سلول‌های بنیادی بالغین مثل سلول‌های بنیادی مشتق از فولیکول مو منبع در دسترس جهت اهداف درمانی محسوب می‌شوند. مطالعات نشان داده این سلول‌ها می‌توانند در محیط کشت تکثیر پیدا کرده و به رده‌های سلولی مختلفی تبدیل شوند [۸،۵،۳]. آنتی‌ژن سطحی CD34 به عنوان مارکر سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش محسوب می‌شود و این مارکر نشانگر بنیادی بودن این سلول‌ها می‌باشد، CD34 یک مولکول غشایی و ترانس ممبرن گلیکوزیله شده است و توسط انواع مختلفی از کینازها مثل پروتئین کیناز C و تیروزین کیناز فسفوزیله می‌شود. آنتی‌ژن CD34 معمول‌ترین مارکر برای جداسازی سلول‌های بنیادی است [۱۰،۹،۲]. سلول‌های بنیادی موش سوری مارکرهای سطح سلولی CD34، K19 و CD200 را بیان می‌کنند و مارکر سطحی CD200 بیشتر در سلول‌های ناحیه بالج انسان بیان می‌شود و از بین تمام مارکرهای سطحی CD34 بهترین مارکر جهت شناسایی و جداسازی سلول‌های بنیادی محسوب می‌شود [۶]. در مطالعات قبلی محققان بیشتر از روش

دستی جهت جداسازی سلول‌های بنیادی ناحیه بالج استفاده می‌کردند و خلوص سلول‌های جدا شده معمولاً نامشخص بود. چندین سال پیش اوهیاما^۲ و همکاران از روش جداسازی تشریح میکروسکوپی جهت جداسازی سلول‌های بنیادی استفاده کردند [۱۱]. تاکنون از روش‌های مختلفی همچون روش جداسازی با فلوسیتومتری و میدان آهنربایی جهت جداسازی سلول‌های بنیادی استفاده شده است. بنابراین جداسازی دقیق سلول‌های بنیادی فولیکول مو که توانایی تمایز به سلول‌های مختلف را داشته باشد در زمینه پزشکی ترمیمی می‌تواند نقش بسزایی را داشته باشد [۲].

در این مطالعه، سلول‌های بنیادی فولیکول مو در محیط کشت حاوی فاکتورهای رشد اپیدرمی^۳ و فیبروبلاستی^۴ کشت داده شدند و با آنتی‌بادی CD34 متصل به میکروبیده^۵ سلول‌های بنیادی فولیکول مو جدا شدند و توان تکثیر این سلول‌ها زیر میکروسکوپ نوری بررسی شد.

روش کار

حیوانات مورد استفاده

در این مطالعه از موش‌های BALB/c ۲ الی ۴ ماهه استفاده شد. حیوانات در قفس‌های استاندارد نگهداری شدند. اتاق نگهداری دارای نور و حرارت کافی بود. شرایط نوری حیوان به صورت ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی بوده و درجه حرارت اتاق در محدوده ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. آب و غذای کافی برای حیوانات بصورت آزاد وجود داشت.

جدا کردن ناحیه بالج فولیکول مو

جهت جدا کردن فولیکول مو و ناحیه بالج از روش تعدیل‌شده کوبایاشی^۶ و همکاران استفاده شد [۱۴].

² Ohyama

³ Epidermal Growth Factor

⁴ Fibroblast Growth Factor

⁵ CD34 Microbead

⁶ Kobayashi

¹ Major Histocompatibility Complex

در این روش بعد از بیهوشی حیوانات با اتر، صورت و سر حیوانات توسط محلول بتادین به مدت ۳ دقیقه شسته شده و به دنبال آن موهای ناحیه صورت تراشیده شده و با الکل ۷۰ درصد تمیز و ضد عفونی می‌شود و بافت لب بالا که حاوی فولیکول‌های موی سبیل موش است، بریده می‌شود. بعد از برداشتن بافت لب بالا در زیر هود و محیط استریل، نمونه‌ها در محیط DMEM/F12 (اینویتروژن)^۱ حاوی پنی‌سیلین (۱۰۰ واحد در میلی‌لیتر- اینویتروژن)، استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر- اینویتروژن)، آموگوتریسین B (۰/۵ میکروگرم در میلی‌لیتر- سیگما) به مدت نیم ساعت قرار داده می‌شود.

کشت سلولی

ناحیه بالچ جدا شده در محلول ۰/۰۱٪ اتیل دی آمین تترا استیک اسید^۲ (EDTA) ۰/۱۲۵٪ تریپسین به مدت ۱۵ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. سلول‌های جدا شده با سرعت rpm ۱۲۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس سلول‌ها به فلاسک‌هایی که قبلاً با کلاژن نوع یک پوشیده شده بودند، انتقال داده شدند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM/F12 حاوی ال-گلوتامین (۴/۳ میلی مول)، انسولین (۵ میکروگرم در میلی‌لیتر)، کلراتوکسین (10^{-9})، هیدروکورتیزون (۰/۵ میلی گرم در میلی‌لیتر)، فاکتور رشد اپیدرمال و فیبروبلاستی (۱۰ نانو گرم در میلی‌لیتر)، و ۱۰٪ سرم گاو کشت داده شدند [۵].

تکنیک مکس^۳ (MACS)

در این روش ابتدا سلول‌ها به مدت ۱۴ روز کشت یافتند، سلول‌های بنیادی بیان کننده CD34 فولیکول مو طبق مراحل زیر جداسازی شد [۲]:

ابتدا سلول‌ها توسط مخلوط ۱:۱ ۰/۱۲۵٪ تریپسین و ۰/۰۲٪ EDTA در طی مدت ۳-۷ دقیقه و در دمای ۳۷ درجه از کف فلاسک جدا شدند و به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm ۲۰۰۰ سانتریفیوژ شدند و بعد از شمارش دوباره توسط PBS استریل شستشو داده شدند. سپس ۱۰ میکرولیتر آنتی‌بادی اولیه CD34 کونزوگه به فیکو اریترین^۴ (PE) (Lifspan Biosciences Inc. Ls, C4951) به محلول حاوی ۲۰ میکرولیتر ماده بلوک کننده^۵ و ۸۰ میکرولیتر بافر جداکننده^۶ اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای ۴ درجه در یخچال انکوبه شدند.

در مرحله بعدی سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه و با سرعت rpm ۲۰۰۰ در سانتریفیوژ با دمای ۸-۲ درجه سانتریفیوژ شدند. بعد محیط رویی بیرون ریخته شد و دوباره ۱-۲ سی سی از بافر جداکننده افزوده شد و دو مرتبه سانتریفیوژ طبق مراحل بالا انجام شد. بعد از خارج کردن مایع رویی حدود ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی ۸۰ میکرولیتر بافر جداکننده و ۲۰ میکرولیتر میکروبیید آنتی PE (MiltenyiBiotec, 130-048-801) روی سلول‌ها افزوده شد و سلول‌ها به مدت ۱۵ دقیقه تحت شرایط تاریکی و در دمای ۸-۲ درجه نگهداری شد. بعد از طی این مدت زمان ۱-۲ سی سی از بافر جداکننده روی ترکیب سلولی افزوده شد و سلول‌ها طبق شرایط ذکر شده سانتریفیوژ شدند. سپس مایع رویی بیرون کشیده شده و حدود ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر روی سلول‌ها افزوده و به صورت کامل هم زده شد. بعد از آماده سازی سلول‌ها طبق مراحل ذکر شده، دستگاه MACS جهت جداسازی به زیر هود منتقل شد. ستون MACS (MS column) در مکنت قرار گرفت و

⁴ Phycoerythrin

⁵ Blocking Reagent

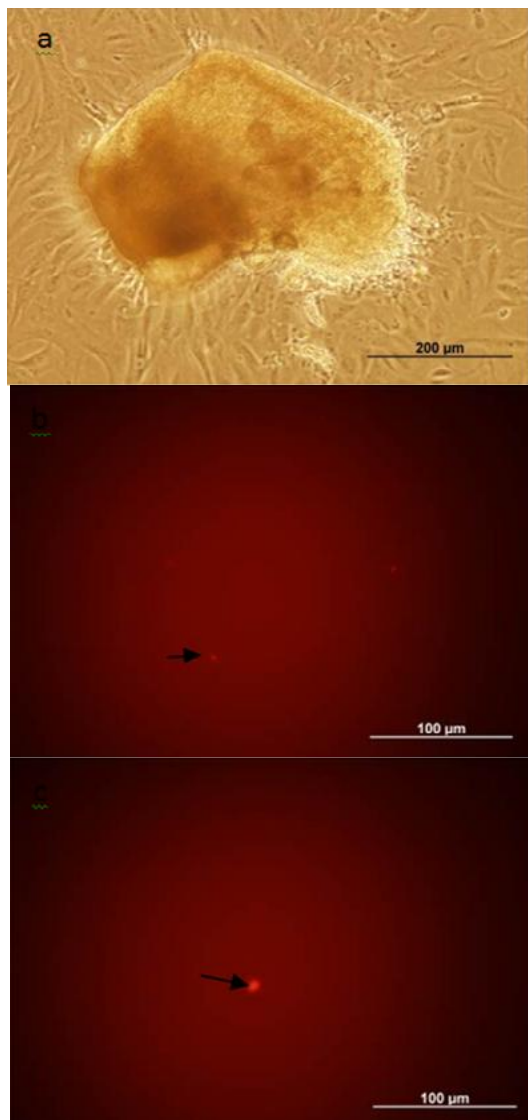
⁶ Separation Buffer

¹ Invitrogen

² Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid

³ Magnetic Activation Cell Sorting

شدند که حدود $12 \pm 1/0.4$ درصد سلول‌ها CD34 مثبت بودند که نمونه‌ای از سلول‌های جدا شده که CD34 مثبت بودند در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.



شکل ۱. سلول‌های ناحیه بالچ ۱۴ روز کشت داده شدند (a) و سلول‌های CD34 مثبت جدا شده با روش MACS در تصاویر b و c مشاهده می‌شوند (فلش)

بقاء سلول‌های جدا شده در محیط کشت بعد از ۷ روز کشت

همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، بعد از حدود هفت روز که این سلول‌ها جداسازی شدند، سلول‌ها در محیط کشت زنده ماندند که در تصاویر رنگ آمیزی شده با DAPI هسته سلول‌ها نرمال بود

سوسپانسیون سلولی به داخل ستون ریخته شد. سلول‌هایی که توسط آنتی بادی CD34 نشان‌دار شده بودند به دلیل خاصیت آهنربایی به ستون آهنربا چسبیدند و سلول‌های غیر نشان‌دار به آرامی از ستون خارج شدند. ستون سه بار متوالی با بافر شسته شد تا سلول‌های غیر نشان‌دار به صورت کامل از ستون شسته شده و بیرون بریزند و از سلول‌های نشان‌دار جدا گردند.

بعد از خروج کامل مایع، ستون از مگنت جدا شد، مقدار ۱۰۰۰ میکرولیتر محیط DMEM به داخل ستون ریخته شد و با فشار پیستون سلول‌ها در یک لوله فالکون استریل خالی شدند و به این ترتیب سلول‌های نشان‌دار شده توسط آنتی بادی با تکنیک MACS جدا سازی شده و کشت داده شدند [۲]. بعد از جداسازی سلول‌ها جهت بررسی نشان‌دار بودن و بیان آنتی‌بادی CD34 زیر میکروسکوپ فلوئورسنت (مدل المپیوس) مورد بررسی قرار گرفتند. جهت بررسی بقاء سلولی، سلول‌ها پس از جدا شدن به مدت یک هفته در حضور سرم و EGF, FGF کشت داده شدند و هر دو روز یکبار محیط سلول‌ها با محیط جدید تعویض می‌شد و در روز هفتم بقاء سلول‌ها با رنگ‌آمیزی هسته سلول‌های بنیادی با ۱ میکروگرم در میلی‌لیتر (1050^1 DAPI, Gerbu) مورد بررسی قرار گرفت.

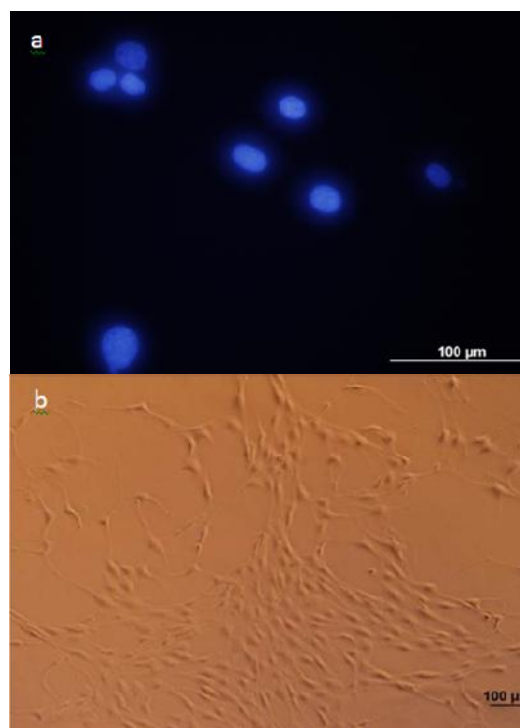
یافته‌ها

جداسازی سلول‌های CD34 مثبت

سلول‌های بنیادی فولیکول مو پس از جداسازی توسط تکنیک MACS کشت داده شدند. در این روش سلول‌های CD34 مثبت بوسیله آنتی‌بادی مونوکلونال CD34 نشان‌دار شدند و به دنبال آن با استفاده از میکروبیید آنتی PE سلول‌ها جداسازی و کشت داده شدند. بعد از جداسازی سلول‌ها با لام نتوبار شمارش

¹ 4',6-diamidino-2-phenylindole

و سلول‌های آپوپتوتیک و یا نکروتیک مشاهده نمی‌شود (شکل ۲).



شکل ۲. سلول‌های CD34 مثبت به مدت یک هفته کشت داده شدند و بعد از رنگ آمیزی با رنگ DAPI مورفولوژی هسته این سلول‌ها نرمال بود (a) و سلول‌های آپوپتوتیک و نکروتیک مشاهده نشد و در شکل b کلونی سلولی حاصل از تکثیر سلول‌ها مشاهده می‌شود.

بحث

مطالعات اخیر نشان دادند که سلول‌های بنیادی در اغلب ارگان‌های بدن همچون عضله قلبی، اسکلتی، کبد، سیستم عصبی، سیستم خونی و اپیدرم قرار دارند [۱] و سلول‌های بنیادی بالغ را می‌توان به صورت اتولوگ استفاده کرد و نیازی به تضعیف سیستم ایمنی هم نیست و مسائل اخلاقی هم مطرح نمی‌شود. از طرفی چون ظرفیت تکثیری سلول‌های بنیادی بالغ کم است، پس تومور هم ایجاد نمی‌کنند [۱۴]. چندین سال است که ناحیه بالج محل سلول‌های بنیادی شناخته شده است. ناحیه بالج نزدیک محل اتصال عضله راست‌کننده مو و غده چربی واقع شده است [۱۵،۶]. یکی از مشکلات مهم جداسازی دستی سلول‌های بنیادی، آلودگی سلولی است که با استفاده از

روش‌های جداسازی سلولی با فلوسیتومتری و یا با سیستم آهنربایی می‌توان این مشکل را مرتفع ساخت. محققین در مطالعه حاضر به این نتیجه رسیدند که حدود ۱۲ سلول جداشده از ناحیه بالج فولیکول مو مارکر سلول‌های بنیادی CD34 را بیان می‌کردند. با سیستم آهنربایی جداسازی شدند، همچنین این سلول‌ها توانستند در محیط کشت زنده بمانند. مشابه این مطالعه، ترمپوس^۱ و همکاران ثابت کردند که سلول‌های CD34⁺ فولیکول مو قدرت تومورزایی دارند، اما به غیر از این نقش تومورزایی، این مارکر نقش متفاوتی در سلول‌های اپی تلیالی- مزانشیمیالی ممکن است داشته باشند و در چرخه فولیکول مو تاثیر متفاوتی ایجاد کنند. در نهایت می‌توان گفت که CD34 ممکن است یکی از عوامل موثر در فعالیت‌های ناحیه بالج فولیکول مو باشد [۱۰]. هونگ^۲ و همکاران توانستند سلول‌های بنیادی فولیکول موی موش صحرایی^۳ را توسط تکنیک مکس جداسازی کنند. آنها سلول‌های بیان کننده CD34 را جداسازی نموده و مشاهده کردند که سلول‌هایی که به میزان بالایی CD34 را بیان می‌کنند، پتانسیل تکثیری بالا و کلونی‌زایی بیشتری را نسبت به سلول‌هایی که CD34 کمتری بیان می‌کنند، دارا هستند. در این تکنیک از مارکرهای سطح سلولی برای جداسازی سلول‌ها استفاده شد [۱۲]. برخلاف فولیکول موی موش که سلول‌های بیان کننده CD34 در قسمت بالج آن قرار گرفته‌اند، در انسان این سلول‌ها در غلاف ریشه‌ای خارجی فولیکول مو واقع شده است. CD34 در فولیکول موی انسان سیکل‌های کاتازن و تلوزن بیان نمی‌شود و تنها مرحله آناتزن در سلول‌های غلاف ریشه‌ای خارجی وجود دارد [۹]. در مطالعه دیگری ال‌سیدی^۴ و همکاران نشان دادند که نوعی سلول‌های بنیادی فولیکول مو بنام سلول‌های بنیادی مشتق از

¹ Trempus

² Huang

³ Rat

⁴ El Seady

تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب شورای پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به شماره ۸۹۳۵۰ می‌باشد و کلیه مراحل این تحقیق در آزمایشگاه تحقیقاتی جنین شناسی و سلول‌های بنیادی گروه علوم تشریحی و پاتولوژی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل انجام گردیده، لذا بدین وسیله مراتب تقدیر و تشکر از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل به عمل می‌آید.

ستیغ عصبی در غلاف ریشه‌ای خارجی فولیکول مو قرار دارد که توانایی تبدیل به سلول‌های شوان، نورون‌های دوقطبی و سلول‌های الیگودندروسیت را دارند [۱۶].

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر یافته‌ها نشان دادند که سلول‌های بنیادی زنده بیان کننده CD34 را می‌توان با سیستم آهنربایی جداسازی کرد و درصد سلول‌های بنیادی در محیط کشت را جهت مطالعات مولکولی و آنالیز ژنومیک و تمایز سلولی افزایش داد.

References

- 1- Mimeault M, Batra SK. Recent progress on tissue-resident adult stem cell biology and their therapeutic implications. *Stem Cell Rev*. 2008 Spring;4(1):27-49.
- 2- Najafzadeh N, Sagha M, Tajaddod SH, Golmohammadi MG, Oskoui NM, Moghaddam MD. In vitro neural differentiation of CD34+ stem cell populations in hair follicles by three different neural induction protocols. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014 Oct; 51(2):192-203.
- 3- Najafzadeh N, Nobakht M, Pourheydar B, Golmohammadi MG. Rat hair follicle stem cells differentiate and promote recovery following spinal cord injury. *Neural Reg Res*. 2013 Dec;8(36):3365.
- 4- Najafzadeh N, Nobakht M, Mansoori K, Niapour A, Golmohammadi M. Electromyographic and behavioral changes after transplantation of hair follicle stem cells into rats with spinal cord injury by compression model. *ZUMS Journal*. 2012 Winter;20(83):31-42. (full text in persian)
- 5- Nobakht M, Najafzadeh N, Safari M, Roshandel NR, Delaviz H, Joghataie MT, et al. Bulge cells of rat hair follicles: Isolation, cultivation, morphological and biological features. *Yakhteh Medical Journal*. 2010 Spring;12(1):51-58.
- 6- Cotsarelis G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J Invest Dermatol*. 2006 Jul;126(7):1459-68.
- 7- Lavker RM, Miller S, Wilson C, Cotsarelis G, Wei ZG, Yang JS, et al. Hair follicle stem cells: their location, role in hair cycle, and involvement in skin tumor formation. *J Invest Dermatol*. 1993 Jul;101(1 Suppl):16S-26S.
- 8- Barthel R, Aberdam D. Epidermal stem cells. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Jul;19(4):405-13.
- 9- Poblet E, Jimenez F, Godinez JM, Pascual-Martin A, Izeta A. The immunohistochemical expression of CD34 in human hair follicles: a comparative study with the bulge marker CK15. *Clin Exp Dermatol*. 2006 Sep;31(6):807-12.
- 10- Trempus CS, Morris RJ, Ehinger M, Elmore A, Bortner CD, Ito M, et al. CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice. *Cancer res*. 2007 Dec;67(9):4173-81.
- 11- Ohyama M, William J. Cunliffe Scientific Awards. Advances in the study of stem-cell-enriched hair follicle bulge cells: a review featuring characterization and isolation of human bulge cells. *Dermatol*. 2007 Jan;214(4):342-51.
- 12- Huang E, Lian X, Chen W, Yang T, Yang L. Characterization of rat hair follicle stem cells selected by vario magnetic activated cell sorting system. *Acta histochem cytochem*. 2009 Sep;42(5):129-36.
- 13- Kobayashi K, Rochat A, Barrandon Y. Segregation of keratinocyte colony-forming cells in the bulge of the rat vibrissa. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Aug;90(15):7391-95.

- 14- Wong CE, Paratore C, Dours-Zimmermann MT, Rochat A, Pietri T, Suter U, et al. Neuralcrest-derived cells with stem cell features can be traced back to multiple lineages in the adult skin. *J cell biol.* 2006 Dec;175(6):1005.
- 15- Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med.* 1999 Aug;341(7):491-97.
- 16- ElSeady R, Huisman MA, Löwik CW, Frijns JH. Uncomplicated differentiation of stem cells into bipolar neurons and myelinating glia. *Biochem biophys res commun.* 2008 Sep;376(2):358-62.